นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism

เรืองรอง ชีพสัตยากร, ธานินทร์ ภู่พัฒน์*, Heinrich F. Steger*,
ปราณี พิสัยพงศ์ และ ลัดดา ฟองสถิตย์กุล****

*ภาควิชาพยาธิวิทยา, *ภาควิชานิติเวชศาสตร์, **ธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200*

บทคัดย่อ : *หมู่เลือด ABO ถูกควบคุมด้วยยีน A, B และ O B allele มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก A allele ที่ตำแหน่ง 526(C⟶G), 703(G⟶A), 796(C⟶A) และ 803(G⟶C) ทำให้การสร้างกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง O allele แตกต่างจาก A และ B allele ที่ตำแหน่ง 261(G⟶del) ทำให้เกิด frameshift และ premature stop codon* ***วัตถุประสงค์ :*** *เพื่อตรวจ ABO genotype ด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)* ***วัสดุและวิธีการ :*** *เก็บตัวอย่างเลือดผู้บริจาคโลหิตจำนวน 70 ราย โดยเลือกผู้บริจาคหมู่ A หมู่ B และหมู่ O อย่างละ 20 ราย และผู้บริจาคหมู่ AB 10 ราย ตรวจ ABO phenotype จาก clotted blood ด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองโดยนำเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับ monoclonal anti-A1, anti-A, anti-B, anti-A,B และนำซีรัมมาทำปฏิกิริยากับ A1 cell และ B cell มาตรฐาน ตัวอย่างเลือด EDTA blood ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex ตรวจแยกชนิด ABO alleles ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ primer mo-57/mo-46 เพิ่มขยายดีเอ็นเอในส่วน exon 6 และ ABO F624-649/ABOR770-798 เพิ่มขยายดีเอ็นเอในส่วน exon 7 นำ PCR product จาก mo-57/mo-46 มาย่อยด้วย Kpn I ซึ่งมีความจำเพาะต่อ GGTAC↓C เพื่อตรวจ O allele และ PCR product จาก ABO F624-649/ABOR770-798 มาย่อยด้วย Hpa II ซึ่งมีความจำเพาะต่อ C↓CGG และ/หรือ Alu I ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AG↓CT เพื่อตรวจ B allele ตรวจ cleavage product ด้วยการทำ electrophoresis บน 8.5% polyacrylamide gel ทำ polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) โดยใช้ primer 261X/261C เพิ่มขยายดีเอ็นเอของ O allele ที่ตำแหน่ง 261(G⟶del) ตรวจ PCR product ด้วย 2% agarose gel electrophoresis* ***ผลการศึกษา :*** *วิธี PCR-RFLP โดยใช้ primer mo-57/mo-46 และ Kpn I คนที่มี O allele Kpn I ย่อยได้เป็น fragment ขนาด 87, 164 bp A หรือ B allele Kpn I ไม่ย่อยเหลือ 252 bp เมื่อใช้ primer ABO F624-649/ABOR770-798 และ Hpa II A หรือ O allele Hpa II ย่อยได้ 4 fragment คือ 78, 19, 24, 54 bp B allele มีตำแหน่ง 703(G⟶A) Hpa II ย่อยได้ 3 fragment คือ 97, 24, 54 bp แต่ fragment ขนาด 19, 24, 54 bp มีขนาดเล็กจึงตรวจไม่พบ เมื่อใช้ primer ABO F624-649/ABOR770-798 และย่อยด้วย Alu I คนที่มี*

ได้รับต้นฉบับ 10 มีนาคม 2546 และให้ตีพิมพ์ 17 มีนาคม 2546

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ พญ.เรืองรอง ชีพสัตยากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

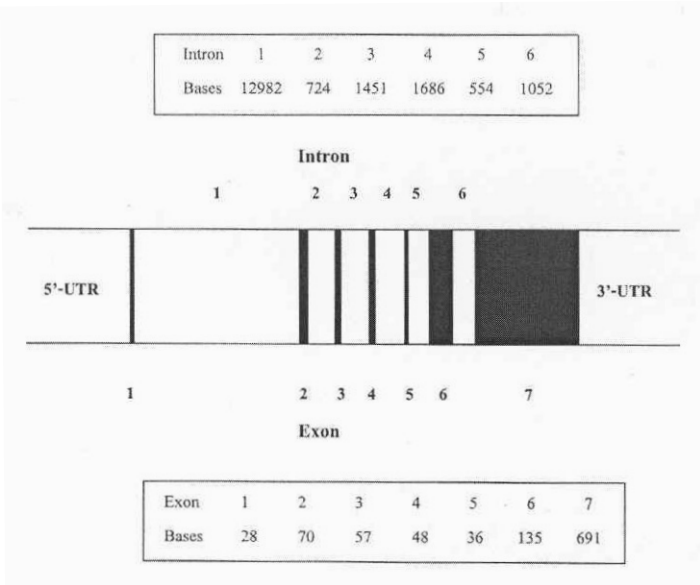
B allele Alu I ย่อยได้ 81, 94 bp A หรือ O allele Alu I ไม่ย่อยเหลือ 175 bp เมื่อนำ fragment ที่ย่อยได้จาก Kpn I มาแปลผลร่วมกับ Hpa II หรือที่ย่อยได้จาก Kpn I แปลผลร่วมกับ Alu I สามารถแยกลักษณะทางพันธุกรรมได้ดังนี้ 1) genotype OO Kpn I พบ 87, 164 bp Hpa II พบ 78 bp Alu I พบ 175 bp 2) genotype AA Kpn I พบ 252 bp Hpa II พบ 78 bp Alu I พบ 175 bp 3) genotype BB Kpn I พบ 252 bp Hpa II พบ 97 bp Alu I พบ 81, 94 bp 4) genotype AB Kpn I พบ 252 bp Hpa II พบ 78, 97 bp Alu I พบ 81, 94, 175 bp 5) genotype AO Kpn I พบ 87, 164, 252 bp Hpa II พบ 78 bp Alu I พบ 175 bp 6) genotype BO Kpn I พบ 87, 164, 252 bp Hpa II พบ 78, 97 bp Alu I พบ 81, 94, 175 bp การตรวจ PCR-SSP ถ้ามี O allele จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 bp ถ้าไม่มี O allele ไม่พบแถบดีเอ็นเอ การตรวจ ABO phenotype ด้วยวิธี serology ร่วมกับวิธี PCR-SSP สามารถแยกลักษณะทางพันธุกรรมเป็น OO, AA, BB, AB, AO, BO ได้เช่นกัน การตรวจ ABO phenotype 70 รายเป็นหมู่เลือด O 20 ราย, A 20 ราย, B 18 ราย, AB 9 ราย, B_{weak} 2 ราย และ $A_{weak}B$ 1 ราย การตรวจ PCR-RFLP และ PCR-SSP พบเป็น genotype OO 20 ราย, AA 3 ราย, AO 17 ราย, BB 6 ราย, BO 14 ราย และ AB 10 ราย โดย phenotype ที่ได้ B_{weak} ทั้ง 2 รายมี genotype เป็น BO และ phenotype $A_{weak}B$ มี genotype เป็น AB ***สรุป :*** *การตรวจ ABO genotype ด้วยวิธี PCR-RFLP 1) สามารถระบุลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือด ABO ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการตรวจหายีน O ด้วยวิธี PCR-SSP ร่วมกับการตรวจ phenotype ด้วยวิธี serology 2) ABO genotype ที่ได้สอดคล้องกับลักษณะ ABO phenotype 3) วิธี PCR-RFLP อาจนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจอื่น เช่น เนื้อเยื่อต่างๆ*

Key Words : ● *ABO genotype* ● *ABO alleles* ● *PCR-RFLP*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546;13:37-52.

หมู่เลือด ABO เป็นหมู่เลือดระบบแรกที่ค้นพบโดย Karl Landsteiner ในปี ค.ศ. 1900 คนหมู่เลือด A มีแอนติเจน A บนเม็ดเลือดแดงมี anti-B ในซีรัม คนหมู่เลือด B มีแอนติเจน B บนเม็ดเลือดแดงมี anti-A ในซีรัม คนหมู่เลือด AB มีทั้งแอนติเจน A และ B บนเม็ดเลือดแดง ไม่มี anti-A และ anti-B ในซีรัม คนหมู่เลือด O ไม่มีแอนติเจน A หรือ B บนเม็ดเลือดแดง แต่มีทั้ง anti-A, anti-B และ anti-A,B ในซีรัม แอนติเจนระบบ ABO นอกจากจะพบบนเม็ดเลือดแดงแล้ว ยังพบบนเซลล์ต่างๆ เช่นเม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือด epithelial cell endothelial cell และในสารคัดหลั่ง เช่น น้ำลาย น้ำตา และน้ำนม แอนติบอดีระบบ ABO เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (naturally occurring antibody) โดยไม่จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นมาก่อน ดังนั้นระบบ ABO จึงเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญมากที่สุดในด้านการให้เลือดและการปลูกถ่ายอวัยวะ[1,2,3] การแสดงออกของหมู่เลือด ABO ถูกควบคุมด้วยยีน[3] ชนิดที่เป็นอิสระต่อกันคือ ABO gene, H gene และ secretor gene ซึ่งได้รับจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ยีน A, B, H, Se เป็นยีนเด่น (dominant gene) ยีน O, h, se เป็นยีนด้อย (recessive gene) ในคนหมู่เลือด A และคนหมู่เลือด B สามารถมี genotype ได้ทั้งแบบ homozygous (AA, BB) หรือแบบ heterozygous (AO, BO) คนหมู่เลือด AB มี genotype เป็นแบบ heterozygous (AB) และ คนหมู่เลือด O มี genotype เป็นแบบ homozygous (OO)[4]

ABO gene อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ตำแหน่ง 9q 34.1-q34.2 ประกอบด้วย 7 exon ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 Genomic organization of the ABO gene

■ = exon □ = intron

UTR = untranslated region

คนหมู่เลือด A ที่มี A1 allele มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เริ่มตั้งแต่ initiation codon จนถึง stop codon จำนวน 19,514 base pairs (bp)[5] ในจำนวนนี้เป็น exon 1-7 ซึ่งจะ transcribe เป็น mRNA จำนวน 1,065 bp (AF 134412 : A101 allele) coding nucleotide sequence ส่วนใหญ่อยู่บน exon ที่ 6 และ 7[6] A1 allele เป็น standard reference สำหรับเปรียบเทียบกับอัลลีลอื่น คนที่มี B allele มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ แตกต่างจาก A1 allele ที่ exon 6 และ exon 7 จำนวน 7 ตำแหน่งคือตำแหน่งเบสที่ 297(A⟶G), 526(C⟶G), 657(C⟶T), 703(G⟶A), 796(C⟶A), 803 (G⟶C) และ 930(G⟶A) (AF 134414 : B101 allele) และที่ 3' untranslated region อีก 1 ตำแหน่งคือตำแหน่ง 1096(G⟶A) จากการศึกษาลำดับเบสของยีน ABO พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่งที่ทำให้การสร้างกรดอะมิโนของยีน A และ B แตกต่างกันคือ[7] 1.) ตำแหน่งเบส 526(C⟶G) ทำให้การสร้างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 176 เปลี่ยนจาก arginine เป็น glycine(176Arg⟶Gly) 2.) ตำแหน่งเบส 703(G⟶A) ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 235 (Gly⟶Ser) 3.) ตำแหน่งเบส 796(C⟶A) ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 266(Leu⟶Met) 4.) ตำแหน่งเบส 803(G⟶C) ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 268 (Gly⟶Ala) การมีกรดอะมิโนเปลี่ยนไปมีผลต่อการจัดเรียงตัวของโปรตีนจึงได้เอนไซม์ transferase ที่ต่างกัน แต่การมี nucleotide substitution ที่ตำแหน่ง 297(A⟶G), 657(C⟶T),930(G⟶A) และ 1096 (G⟶A) ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการสร้างกรดอะมิโน (silent mutation)[8] คนหมู่เลือด O ที่มี O1 allele มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก A1 allele คือตำแหน่งเบสที่ 261 มี G deletion[261(G⟶del)] ที่ exon 6 (AF 134415 : O01 allele) ทำให้เกิด frameshift mutation และ premature stopcodon คนหมู่เลือด O จึงสร้าง inactive transferaseenzyme ซึ่งไม่สามารถสร้างแอนติเจน A และ B ได้

การตรวจหมู่เลือด ABO โดยทั่วไปจะตรวจ phenotype โดยใช้เทคนิคทาง serology ด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลอง[9] ซึ่งอาศัยหลักการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่จำเพาะ (agglutination) โดยตรวจหาแอนติเจน A และ B บนเม็ดเลือดแดง (cell grouping) และตรวจหา anti-B และ anti-A ในซีรัม (serum grouping) แต่ในบางกรณีเช่น ตัวอย่างเลือดมีน้อย การตรวจทาง serology อาจทำได้ไม่สมบูรณ์หรือทำไม่ได้ การตรวจดีเอ็นเอเพื่อหา ABO alleles ด้วยวิธี polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)[10-13] และวิธี polymerase chain reaction- sequence specific

primer (PCR-SSP)[14-16] ช่วยแก้ปัญหาได้ อีกทั้งยังสามารถแยกลักษณะทางพันธุกรรมเป็น genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพิสูจน์บุตร พิสูจน์บุคคล พิสูจน์ชีววัตถุพยาน และทำให้ทราบหมู่เลือดที่ถูกต้อง เมื่อมีข้อขัดแย้งในการแปลผลหมู่เลือดเช่น cell grouping และ serum grouping ให้ผลไม่สอดคล้องกัน (ABO discrepancy)

PCR-RFLP เป็นการตรวจ ABO alleles ด้วยทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ primer ที่คร่อมตำแหน่งที่ต้องการตรวจเช่น exon 6 และ exon 7 นำ PCR product มาย่อยด้วย restriction enzyme ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ต้องการได้ fragment ขนาดต่างกัน ตรวจ cleavage product ด้วยการทำ electrophoresis ใน polyacrylamide gel เปรียบเทียบ DNA fragment กับดีเอ็นเอมาตรฐาน positive และ negative control เอนไซม์ *Kpn* I ใช้ย่อยเพื่อตรวจตำแหน่ง 261(G⟶del) ใน O allele เอนไซม์ *Hpa* II และ *Alu* I ใช้ย่อยตรวจ B allele ที่ตำแหน่ง 703(G⟶A)[12,17] PCR-SSP เป็นการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ allele specific primer จากนั้นตรวจ PCR product ด้วยการทำ electrophoresis ใน agarose gel ถ้ามียีนที่จำเพาะกับ primer จะเกิด specific band ขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจ ABO genotype ด้วยวิธี PCR-RFLP

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด clotted blood และ EDTA blood จากผู้บริจาคโลหิตที่ธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 70 ราย โดยคัดเลือกผู้บริจาคดังนี้

1. ผู้บริจาคหมู่ A 20 ราย หมู่ B 20 ราย หมู่ O 20 ราย และหมู่ AB 10 ราย

2. ในผู้บริจาคหมู่ A และหมู่ B ได้มีการซักประวัติหมู่เลือดบิดาและมารดาของผู้บริจาค เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มี genotype ครอบคลุมทั้งแบบ homozygous และ heterozygous

- Heterozygous AO และ BO เลือกจากผู้บริจาคหมู่ A และหมู่ B ที่มีบิดาหรือมารดาคนใดคนหนึ่งเป็นหมู่ O
- ผู้ที่คาดว่าจะเป็น homozygous AA และ BB เลือกจากผู้บริจาคหมู่ A และหมู่ B ที่มีบิดาหมู่ A หรือ B และมารดาหมู่ AB หรือผู้ที่มีมารดาหมู่ A หรือ B แต่มีบิดาหมู่ AB

ผู้บริจาคทั้งหมดนี้ได้มีการลงนามในหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยอย่างเป็นลายลักษณ์อักษร

การตรวจหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี serology

ตรวจ ABO phenotype จาก whole blood เบื้องต้นด้วยวิธี slide test กับ anti-A, anti-B, anti-A,B และตรวจยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลอง[9] โดยนำเม็ดเลือดแดงจาก clotted blood มาทำปฏิกิริยากับ monoclonal anti-A, anti-A1 , anti-B, anti-A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) และนำซีรัมมาทำปฏิกิริยากับเซลล์มาตรฐาน A1 cells และ B cells อ่านผลจากปฏิกิริยา agglutination และ hemolysis

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจาก EDTA blood ด้วย Chelex[18] โดยผสม whole blood 30 μL กับน้ำกลั่น 1 mL ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL เขย่าด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก นำตะกอนที่ได้ไปปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น (10,000 g, 1 นาที) จำนวน 3 ครั้ง ดูดส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติมเม็ด Chelex 100 (BioRad, USA) ลงไปพอท่วมตะกอน เติมน้ำกลั่น 150 μL นำไปอบที่อุณหภูมิ 56 °C ค้างคืน vortex และนำไปปั่น 3,000 g, 10 วินาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 8 นาที

vortex และนำไปปั่น 10,000 g, 1 นาที จะได้น้ำสกัดดีเอ็นเอ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C จนกว่าจะทดสอบ

การตรวจ ABO alleles ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทำ PCR 2 reaction โดยผสม primer mo-57/mo-46 เพื่อเพิ่มขยายยีน ABO ในส่วน exon 6[10,11] และ primer ABOF624-649/ABOR770-798 เพื่อเพิ่มขยายยีนส่วน exon 7 ดังนี้

1. mo-57 (forward : 5'- CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCTGCCA -3') และ mo-46 (reverse : 5'- CGGAATTCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3')

2. ABOF624-649 (forward : 5'- GTGCGTGGACGTGGACATGGAGTTCC-3') และ ABOR 770-798 (reverse : 5'-CAGGTAGTAGAAATCGCCCTCGTCCTTGG-3')

primer mo-57/mo-46

Reaction mixture 15 μL ประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 1,000 genome copies (ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำสกัดดีเอ็นเอจาก Chelex 1.5 μL), 0.2 μM of each primer, 100 μM dNTPs, 0.3 unit Taq polymerase และ 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA, 0.05% Tween-20 ทำ PCR amplification เริ่มด้วย denaturation 94˚C 2 นาที ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบๆ ดังนี้ denaturation 94˚C 30 วินาที annealing 63˚C 30 วินาที และ extension 72˚C 1 นาที จำนวน 10 รอบ และ denaturation 94˚C 30 วินาที annealing 61˚C 30 วินาที และ extension 72˚C 1 นาที จำนวน 25 รอบ (Hybaid PCR machine, United Kingdom) ตรวจ PCR product ด้วยการทำ electrophoresis โดย load PCR product 8 μL ใน 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide ความต่างศักย์ 50 V เป็นเวลา 40 นาที มองหาแถบดีเอ็นเอขนาด 251-252 bp

การย่อยด้วยเอนไซม์ *Kpn* I

ย่อย PCR product จาก mo-57/ mo-46 4 μL โดยเติม 10 unit *Kpn* I (Invitrogen, USA) และ 5 mM $MgCl_2$ incubate ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจ cleavage product ด้วยการทำ electrophoresis ใน 8.5% polyacrylamide gel ความต่างศักย์ 56 V, 16.5 ชั่วโมง ย้อมด้วย silver nitrate ตรวจ DNA fragment ขนาด 87 และ 164 bp เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder, Invitrogen, USA) และดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด OO, AA, BB, AB, AO, BO เป็น control

Primer ABOF624-649/ABOR770-798

Reaction mixture 15 μL ประกอบด้วยน้ำสกัดดีเอ็นเอประมาณ 1,000 genome copies, 0.26 μM of each primer, 100 μM dNTPs, 0.3 unit *Taq* polymerase และ 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA, 0.05% Tween-20 ทำ PCR amplification เริ่มด้วย denaturation 94˚C 2 นาที ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบๆ ดังนี้ denaturation 94˚C 45 วินาที annealing 60˚C 30 วินาที และ extension 72˚C 1 นาที จำนวน 35 รอบ นำ PCR product มาทำ ethanol precipitation ด้วยการเติม 70% ethanol และ 0.5 mM $MgCl_2$ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่น 10,000 g, 15 นาที ดูด supernatant ทิ้ง ปั่นล้างด้วย 70% ethanol อีกครั้ง ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 จำนวน 15 μL เพื่อละลาย ตรวจ precipitate product โดยทำ electrophoresis บน 2% agarose gel มองหาแถบดีเอ็นเอขนาด 175 bp

การย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

นำ precipitate product 4 μL มาย่อยด้วย 10 unit *Hpa* II (Invitrogen, USA)ใน 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$ (React 8, Invitrogen,

USA) incubate ที่อุณหภูมิ 37˚C 3 ชั่วโมง ตรวจ cleavage product ด้วยการทำ electrophoresis ใน 8.5% polyacrylamide gel ตรวจหา DNA fragment ขนาด 78 และ 97 bp

การย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu* I

การย่อยด้วย *Alu* I ทำ PCR amplification โดยใช้ primer ABOF624-649/ABOR770-798 เป็น reaction mixture 15 μL เช่นเดียวกับ PCR สำหรับ *Hpa* II แต่การย่อยด้วย *Alu* I ไม่ต้องทำ ethanol precipitation นำ PCR product 4 μL มาย่อยด้วยการเติม 10 unit *Alu* I (Invitrogen, USA) และ 10 mM $MgCl_2$ incubate ที่อุณหภูมิ 37˚C 3 ชั่วโมง ตรวจ cleavage product ด้วยการทำ electrophoresis ใน 8.5% polyacrylamide gel ตรวจหา DNA fragment ขนาด 81 และ 94 bp

ดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด OO, AA, BB และ AB ที่ใช้เป็น control ได้จากผู้ที่มาขอตรวจพิสูจน์พ่อแม่ลูกที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตรวจ genotype ด้วยวิธี PCR-SSP ร่วมกับวิธี serology ดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด AO และ BO ได้จากผู้บริจาคโลหิตที่ธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และได้ยืนยันผล ABO genotype จากการตรวจ PCR-RFLP และ PCR-SSP ที่ Blood Centre, University Hospital, Lund, Sweden

การตรวจ O allele ด้วยวิธี PCR-SSP[19]

ทำการเพิ่มขยายยีนในส่วน exon 6 โดยใช้ primer 261X /261C ดังนี้ 261X (forward : 5'-GTGGAA GGATGTCCTCGTGGTAC-3')และ 261C(reverse:5'-AATGTCCACAGTCACTCGCCACT-3')

Reaction mixture 10 μL ประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 667 genome copies (น้ำสกัดดีเอ็นเอ 1 μL), 0.5 ?M of each primer, 200 μM dNTPs, 0.4 unit *Taq* polymerase และ 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA, 0.05% Tween-20 นำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้ 94˚C 1 นาที, 66˚C 30 วินาที และ 72˚C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ ตรวจ PCR product ซึ่งมีขนาด 195 bp โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis positive control คือดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด OO และ negative control คือดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด AB

การแปลผลหมู่เลือด

การตรวจด้วยวิธี serology

การแปลผล ABO phenotype จาก cell grouping และ serum grouping แสดงไว้ในตารางที่ 1

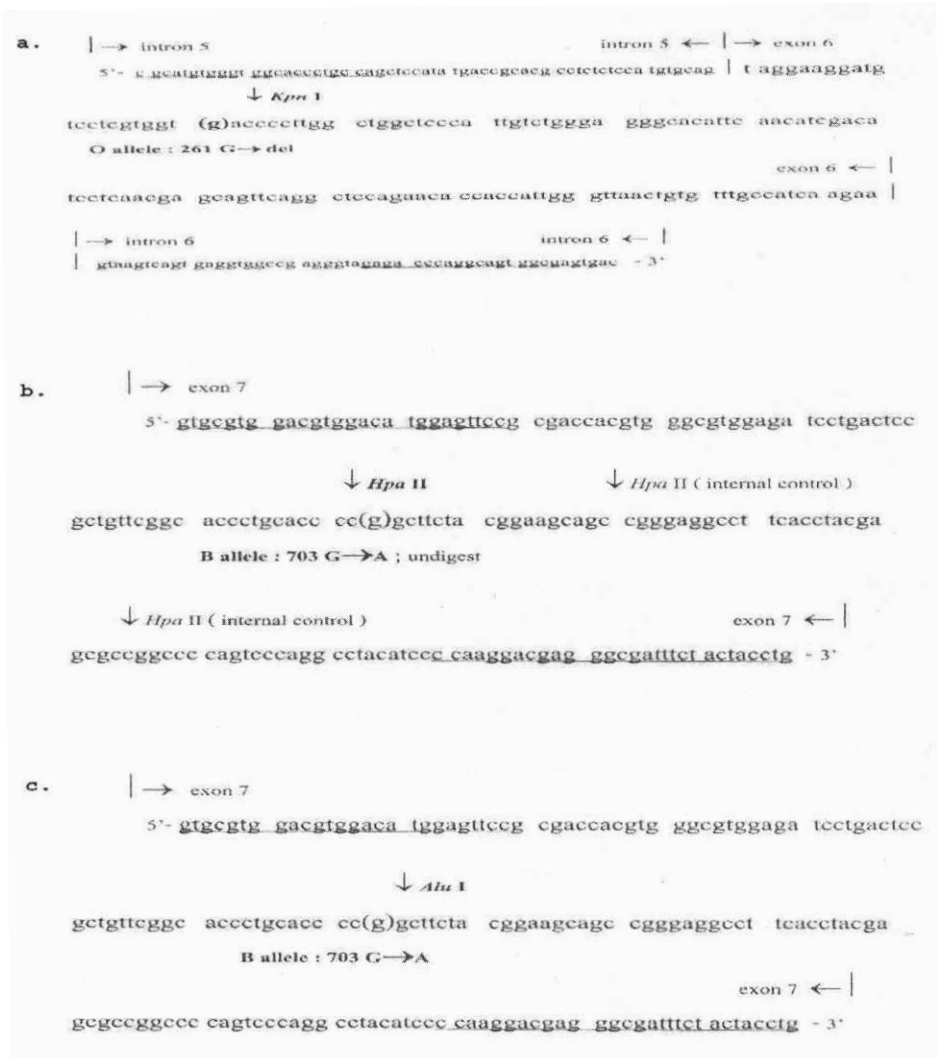
PCR-RFLP

การแปลผล ABO genotype อาศัยความสามารถการย่อยของเอนไซม์ *Kpn* I, *Hpa* II และ *Alu* I ดังแสดงในรูปที่ 2 และตารางที่ 2 expected

ตารางที่ 1 ABO phenotyping by serologic method

Blood group	Cell grouping*				Serum grouping*	
	Anti-A	Anti-A_1	Anti-B	Anti-A,B	A_1 cell	B cell
A	+	+	0	+	0	+
B	0	0	+	+	+	0
O	0	0	0	0	+	+
AB	+	+	+	+	0	0

** = standard tube tests for ABO type of red cells and serum; + = agglutination; 0 = no agglutination*



รูปที่ 2 A, B and O alleles detection by PCR-RFLP.

a. PCR exon 6 amplification with primer mo-57/46 followed by *Kpn* I restriction

b. PCR exon 7 amplification with primer ABOF624-649/R770-798 followed by *Hpa* II restriction

c. PCR exon 7 amplification with primer ABOF624-649/R770-798 followed by *Alu* I restriction

fragment ของหมู่เลือด OO, AA, BB, AB, AO และ BO แสดงไว้ในตารางที่ 3

PCR-SSP

ถ้าพบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 bp แสดงว่าคนนั้นมี O allele (OO, AO, BO) ถ้าไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 bp แสดงว่าไม่มี O allele (AA, BB, AB)

ผลการศึกษา

ผู้บริจาคโลหิต 70 ราย การตรวจ serology เป็นหมู่เลือด O 20 ราย หมู่เลือด A 20 ราย หมู่เลือด B 18 ราย หมู่เลือด AB 9 ราย และหมู่เลือด B_{weak} 2 ราย หมู่เลือด $A_{weak}B$ 1 ราย หมู่เลือด B_{weak} และ $A_{weak}B$ มีลักษณะแตกต่างจากคนปกติดังนี้ หมู่เลือด B_{weak} :

ตารางที่ 2 Nucleotides detectable by PCR-RFLP and PCR-SSP

Primers designation	Mutation	Alleles detectable	PCR product		Restriction		Fragments obtained(bp)*
			start	end	enzyme	specificity	
PCR-RFLP							
mo-57/46			intron 5	intron 6			
	261G⟶del	O			*Kpn* I	GGTAC↓C	87+164
	261 = G	A,B					252
ABOF624-649/			exon 7	exon 7			
R770-798							
	703G⟶A	B			*Hpa* II	C↓CGG	97+24+54
	703 = G	A,O					78+19+24+54
	703G⟶A	B			*Alu* I	AG↓CT	81+94
	703 = G	A,O					175
PCR-SSP							
261X/261C			exon 6	intron 6			
	261G⟶del	O			not done		195
	261 = G	A,B					-

** 19, 24 and 54 bp fragments can not be detectable by polyacrylamide gel electrophoresis.*

ตารางที่ 3 ABO genotyping by PCR-RFLP and PCR-SSP

ABO genotype	Expected fragments (bp) from PCR-RFLP			PCR-SSP
	***Kpn* I**	***Hpa* II***	***Alu* I**	
OO	87, 164	78, 19, 24, 54	175	195
AA	252	78, 19, 24, 54	175	-
BB	252	97, 24, 54	81, 94	-
AB	252	97, 78, 19, 24, 54	81, 94, 175	-
AO	87, 164, 252	78, 19, 24, 54	175	195
BO	87, 164, 252	97, 78, 19, 24, 54	81, 94, 175	195

** 19 , 24 and 54 bp fragments can not be detectable by polyacrylamide gel electrophoresis.*

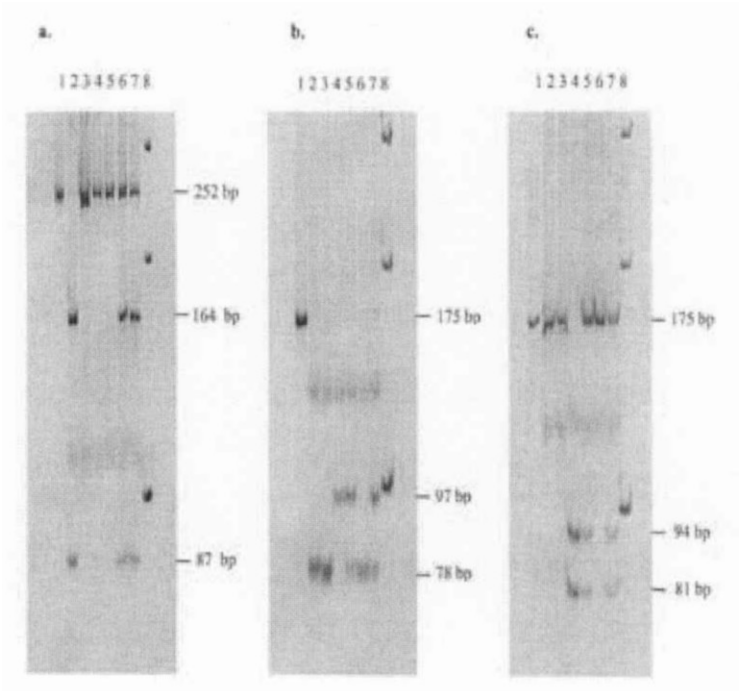
เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยาให้ผลลบกับ anti-A, anti-B, anti-A,B ด้วยวิธี slide test แต่ให้ผล 2+ และมีลักษณะ mixed-field agglutination (mf) กับ anti-B และ anti-A,B ด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลอง พบ anti-A และ weak anti-B ในซีรัมซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของตัวเองและไม่พบ unexpected anti-body คนหมู่เลือด B_{weak} มีแอนติเจน B บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงน้อย การตรวจ serology ด้วยวิธี slide test จึงไม่เห็นปฏิกิริยาทำให้แปลผลเป็นหมู่เลือด O แต่การตรวจ cell grouping และ serum grouping เพื่อยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองพบเป็น B_{weak} หมู่เลือด $A_{weak}B$: เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยาให้ผลลบกับ

anti-A ให้ผลบวกกับ anti-B และ anti-A,B ด้วยวิธี slide test แต่การตรวจหมู่เลือดด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองพบว่าเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยาให้ผลลบกับ anti-A_1 ให้ผล 2^+ กับ anti-A และให้ผล 4^+ กับ anti-B, anti-A,B ไม่พบ anti-A และ anti-B ในซีรัม และไม่พบ unexpected antibody คนหมู่เลือด $A_{weak}B$ มีแอนติเจน A บนผิวเม็ดเลือดแดงน้อย การตรวจ slide test จึงแปลผลเป็นหมู่เลือด B แต่การตรวจ cell grouping และ serum grouping พบเป็น $A_{weak}B$ ในรายของ B_{weak} และ $A_{weak}B$ ได้ติดตามผู้บริจาคมาตรวจหมู่เลือดซ้ำในเวลา 1 ปีถัดมา พบว่าผู้บริจาคเป็น B_{weak} และ $A_{weak}B$ เหมือนเดิม

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ primer mo-57/46 เพิ่มขยายยีน ABO ในส่วน exon 6 (เริ่มตั้งแต่ intron 5 จนถึง intron 6) ได้ PCR product 252 bp สำหรับ A หรือ B allele ส่วน O allele จะได้ PCR product 251 bp เนื่องจากตำแหน่ง 261(G⟶del) ที่ exon 6 เมื่อนำ PCR product ที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ *Kpn* I ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับเบส GGTAC↓C ในคนที่มี O allele *Kpn* I ย่อยได้ออกเป็น 2 fragments คือ 87, 164 bp ในคนที่มี A หรือ B allele *Kpn* I ไม่ย่อยเหลือ 252 bp เหมือนเดิม(รูปที่ 2 a และตารางที่ 2) ดังนั้นเมื่อย่อยด้วย *Kpn* I คนที่มี genotype OO จึงพบ 87, 164 bp คนที่มี genotype AA, BB, AB *Kpn* I ไม่ย่อยเหลือ 252 bp คนที่มี genotype AO หรือ BO *Kpn* I ย่อยได้บางส่วนเนื่องจากมี O allele บางส่วนไม่ย่อยเนื่องจากมี A หรือ B allele จึงพบทั้ง 3 fragments คือ 87, 164, 252 bp (ตารางที่ 3) รูปแบบการย่อยของ *Kpn* I ใน genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO แสดงไว้ในรูปที่ 3 a ในการย่อย PCR product ด้วย *Kpn* I พบ nonspecific band ขนาดประมาณ 110 bp ร่วมด้วย แถบดีเอ็นเอนี้เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียใน *Kpn* I เพราะได้ทดลองเอา *Kpn* I มาทำ electrophoresis บน polyacrylamide gel โดยไม่ใส่ PCR product ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 110 bp นี้เช่นกัน

เมื่อใช้ primer ABOF624-649/R770-798 เพิ่มขยายยีน ABO ในส่วน exon 7 จะได้ PCR product 175 bp เมื่อนำ PCR product มาย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับเบส C↓CGG ในคนที่มี A หรือ O allele *Hpa* II จะย่อยที่ตำแหน่ง 701↓702, 720↓721, 744↓745 ออกเป็น 4 fragment คือ 78, 19, 24, 54 bp คนที่มี B allele มีตำแหน่ง 703(G⟶A) *Hpa* II ไม่ย่อยที่ตำแหน่ง 701↓702 cleavage product จึงได้ 3 fragment คือ 97, 24, 54 bp (รูปที่ 2 b และตารางที่ 2) ตำแหน่ง 720↓721 และ 744↓745 เป็น internal control ซึ่งทั้ง A, B และ O allele ต้องย่อยได้ ดังนั้น fragment ขนาด 24, 54 bp จึงพบได้ทุกคน คนที่มี genotype OO, AA, AO เมื่อย่อยด้วย *Hpa* II จะได้ 78, 19, 24, 54 bp คนที่มี genotype BB ได้ 97, 24, 54 bp คนที่มี genotype AB หรือ BO Hpa II ย่อยได้บางส่วนเนื่องจากมี A หรือ O allele บางส่วนไม่ย่อยเนื่องจากมี B allele จึงได้ 5 fragment คือ 97, 78, 19, 24, 54 bp (ตารางที่ 3) เนื่องจากดีเอ็นเอของ fragment ขนาด 19, 24, 54 bp มีขนาดเล็ก polyacrylamide gel ไม่สามารถตรวจได้ ดังนั้น fragment ที่ตรวจพบจึงมีเพียง 97, 78 bp รูปแบบการย่อยของ *Hpa* II ใน genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO แสดงไว้ในรูปที่ 3 b *Hpa* II ทำให้มี nonspecific band ขนาดประมาณ 130 bp ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียปนเปื้อนใน *Hpa* II เพราะได้นำ *Hpa* II มาทำ electrophoresis โดยไม่ใส่ PCR product ก็พบแถบดีเอ็นเอขนาด 130 bp

PCR product ที่ได้จากการ amplification โดยใช้ primer ABOF624-649/R770-798 เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu* I ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับเบส AG↓CT ในคนที่มี B allele มีตำแหน่ง 703(G⟶A) *Alu* I จะ



รูปที่ 3 The PCR-RFLP patterns of ABO alleles

a. PCR amplification with primer mo-57/46 followed by *Kpn* I restriction which digested O allele.
lane 1. undigest 252 bp; lane 2. genotype OO; lane 3. genotype AA; lane 4. genotype BB;
lane 5. genotype AB; lane 6. genotype AO; lane 7. genotype BO; lane 8. 100 bp ladder DNA

b. PCR amplification with primer ABOF624-649/R770-798 followed by *Hpa* II restriction which digested all alleles but gave different fragments.
lane 1. undigest 175 bp; lane 2. genotype OO; lane 3. genotype AA; lane 4. genotype BB;
lane 5. genotype AB; lane 6. genotype AO; lane 7. genotype BO; lane 8. 100 bp ladder DNA

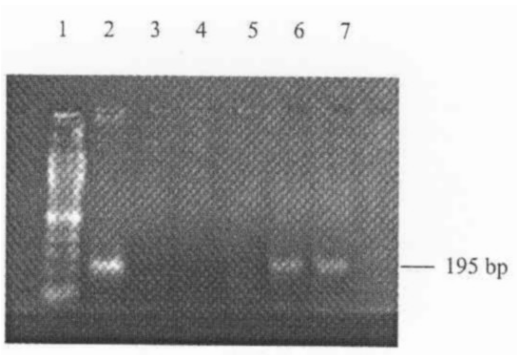
c. PCR amplification with primer ABOF624-649/R770-798 followed by *Alu* I restriction which digested B allele.
lane 1. undigest 175 bp; lane 2. genotype OO; lane 3. genotype AA; lane 4. genotype BB;
lane 5. genotype AB; lane 6. genotype AO; lane 7. genotype BO; lane 8. 100 bp ladder DNA

ย่อยที่ตำแหน่ง 704↓705 ได้เป็น fragment ขนาด 81, 94 bp คนที่มี A หรือ O allele *Alu* I ไม่ย่อยเหลือ 175 bp เหมือนเดิม (รูปที่ 2 c และตารางที่ 2) คนที่มี genotype BB เมื่อย่อยด้วย *Alu* I พบ 81, 94 bp คนที่มี genotype BO และ AB *Alu* I ย่อยได้บางส่วน เพราะมี B allele แต่ A หรือ O allele ย่อยไม่ได้จึงพบ 81, 94, 175 bp ส่วนคนที่มี genotype AA, AO, OO *Alu* I ย่อยไม่ได้เลยเหลือ 175 bp (ตารางที่ 3) รูปแบบการย่อยของ *Alu* I ใน genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO แสดงไว้ในรูปที่ 3 c *Alu* I มีแบคทีเรียปนเปื้อนจึงมี nonspecific band ขนาดประมาณ 120 bp ร่วมด้วย ซึ่งทราบจากการนำ *Alu* I มาทำ electrophoresis โดยไม่ใส่ PCR product

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCR-SSP ตรวจเพียง O allele ในคนที่มี genotype OO, AO, BO จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 bp คนที่มี genotype AA, BB, AB ไม่พบแถบดีเอ็นเอ รูปแบบการตรวจ PCR-SSP ของคนที่มี genotype OO, AA, BB,

ตารางที่ 4 ABO phenotypes and genotypes in this study

ABO phenotype	Numbers tested	ABO genotype	Numbers found
A	20	AA	3
		AO	17
B	18	BB	6
		BO	12
B_{weak}	2	BO	2
AB	9	AB	9
$A_{weak}B$	1	AB	1
O	20	OO	20



รูปที่ 4 The PCR-SSP pattern of O allele.

lane 1. 100 bp ladder DNA; lane 2. genotype OO; lane 3. genotype AA; lane 4. genotype BB; lane 5. genotype AB; lane 6. genotype AO; lane 7. genotype BO

AB, AO และ BO แสดงไว้ในรูปที่ 4 จากการตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของผู้บริจาคโลหิต 70 ราย ด้วยวิธี PCR-RFLP และ PCR-SSP เป็น genotype OO 20 ราย, AA 3 ราย, AO 17 ราย, BB 6 ราย, BO 14 ราย, AB 10 ราย ในผู้บริจาคหมู่เลือด B_{weak} พบเป็น genotype BO ทั้ง 2 ราย หมู่เลือด $A_{weak}B$ พบเป็น genotype AB (ตารางที่ 4) การตรวจ O allele โดยวิธี PCR-SSP ได้ผลสอดคล้องกับการย่อยด้วย *Kpn* I และการตรวจ B allele โดยการย่อยด้วย *Alu* I ได้ผลสอดคล้องกับการย่อยด้วย *Hpa* II

วิจารณ์

Primer ที่ใช้ทำ PCR-RFLP ต้องเพิ่มขยายดีเอ็นเอของคนได้ทุกหมู่ primer ABOF624-649/R770-798 มีจุดเริ่มต้นที่ตำแหน่ง 624-649 ของ exon 7 และสิ้นสุดที่ตำแหน่ง 770-798 ตำแหน่ง 649 และ 770 เป็นตำแหน่งที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง A, B และ O allele ดังนั้น ABOF624-649/R770-798 จึงเพิ่มขยายได้ทั้ง A, B และ O allele ให้ PCR product ขนาด 175 bp primer mo-57/mo-46 มีจุดเริ่มต้นที่ตำแหน่ง 497-519 ของ intron 5 และจุดสิ้นสุดที่ตำแหน่ง 27-50 ของ intron 6 โดยตำแหน่ง 519 ของ intron 5 และตำแหน่ง 27 ของ intron 6 เป็นตำแหน่งที่ A, B และ O allele เหมือนกัน การทำ PCR-RFLP โดยทั่วไปไม่จำเป็นต้องทำ enzyme restriction site ที่ primer แต่ primer mo-57/mo-46[10] ที่นำมาใช้ออกแบบสำหรับทำ ABO genotyping และ cloning ดังนั้นจึงมี artificial sequence แทรกอยู่ด้าน 5' ซึ่งเป็น restriction site ของ *Bam*H I (G↓GATCC) และ *Eco*R I (G↓AATTC) ร่วมด้วย primer mo-57/mo-46 เพิ่มขยายยีน A หรือ B ได้ PCR product ขนาด 252 bp (artificial mo-57 + intron 5 + exon 6 + intron 6 + artificial mo-46) ส่วน O allele มีตำแหน่ง 261(G⟶del) ที่ exon 6 PCR product จึงมีขนาดลดลงเป็น 251 bp

เอนไซม์ *Hpa* II เตรียมจาก Haemophilus parainfluenzae มีความจำเพาะต่อการย่อยที่ลำดับเบส C↓CGG เนื่องจาก *Hpa* II ต้องย่อย PCR product ถึง 3 ตำแหน่ง ดังนั้นหลังจากทำ PCR amplification จำเป็นต้องทำ ethanol precipitation เปลี่ยน buffer ให้เหมาะสมเพื่อให้ *Hpa* II ทำงานได้เต็มที่ *Hpa* II ทำให้เกิด nonspecific band ขนาดประมาณ 130 bp nonspecific band นี้อาจรบกวนการแปลผล ถ้า *Hpa* II ย่อย internal control ไม่หมด (พบ fragment ขนาด 121 bp ร่วมด้วย) เอนไซม์ *Alu* I ใช้ย่อยเพื่อตรวจ B allele ที่ตำแหน่ง 703(G⟶A)ได้เช่นเดียวกับ *Hpa* II *Alu* I เตรียมจาก Arthrobacter luteus มีความจำเพาะต่อการย่อยที่ลำดับเบส AG↓CT *Alu* I เป็นเอนไซม์ที่ย่อยง่ายเพราะย่อยตำแหน่งเดียว ไม่จำเป็นต้องทำ ethanol precipitation ก่อนย่อย จึงมีผู้นิยมใช้ *Alu* I มากกว่า *Hpa* II[12,13] แต่ *Alu* I ไม่มี internal control ดังนั้นกระบวนการย่อยต้องมี genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO เป็น control ทุกครั้ง *Alu* I ทำให้มี nonspecific band ขนาดประมาณ 120 bp ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการผลิต แต่ nonspecific band นี้ไม่รบกวนการแปลผล

เมื่อใช้ primer mo-57/mo-46 เพิ่มขยายยีน ABO และย่อยด้วยเอนไซม์ *Kpn* I ซึ่งเตรียมจาก Klebsiella pneumoniae และมีความจำเพาะต่อ GGTAC↓C ในคนที่มี O allele มีตำแหน่ง 261(G⟶del)ที่ exon 6 จึงพบลำดับเบสเป็น GGTACC อยู่ 1 ตำแหน่ง *Kpn* I จึงย่อยได้ คนที่มี A หรือ B allele *Kpn* I ไม่ย่อย *Kpn* I ทำให้มี nonspecific band ขนาดประมาณ 110 bp ซึ่งไม่รบกวนการแปลผล *Kpn* I เป็นเอนไซม์ที่ย่อยง่าย จึงมีผู้ใช้อย่างกว้างขวาง[12,13,17] การตรวจสอบ PCR product ด้วยการทำ electrophoresis บน agarose gel ก่อนนำไปย่อยด้วย restriction enzyme เป็นการตรวจว่าดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบนี้ใช้ได้ และยังทำให้ทราบปริมาณของ PCR product โดยประมาณจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย ethidium bromide เนื่องจากคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอของแต่ละคนไม่เท่ากัน น้ำสกัดดีเอ็นเอบางรายอาจมีฮีโมโกลบินเจือปน ฮีโมโกลบินเป็นตัวยับยั้งในปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีน ดังนั้นเมื่อทดสอบ PCR product บน agarose gel ถ้าสังเกตเห็นว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างจากดีเอ็นเอมาตรฐานมาก ปริมาณ PCR product ที่นำไปย่อยอาจต้องปรับใหม่ตามความเหมาะสม เนื่องจากการแปลผลหมู่เลือด ใช้วิธีแปลผลจากการย่อยได้หรือไม่ย่อย ถ้าปริมาณ PCR product ที่นำมาย่อยมากเกินความสามารถของ restriction enzyme อาจทำให้ย่อยไม่หมดและแปลผลหมู่เลือดผิด การทำ PCR-RFLP จำเป็นต้องใช้ polyacrylamide gel เนื่องจาก cleavage product ที่ย่อยได้จาก *Hpa* II (78, 97 bp) และ *Alu* I (81, 94 bp) มีขนาดแตกต่างกันน้อยคือ 19 bp และ 13 bp ตามลำดับ agarose gel ซึ่งมีความสามารถในการแยกแยะ (resolution) น้อยจะแยกไม่ได้ แต่การย่อยด้วย *Kpn* I cleavage product ที่ได้มีขนาดต่างกัน 77 bp (87, 164 bp) agarose gel อาจนำมาใช้ได้ แต่ fragment ขนาด 87 bp อาจตรวจไม่พบ พบเพียง fragment ขนาด 164 bp

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเออาจสกัดด้วยวิธี Chelex, salting out หรือ phenol chloroform Chelex เป็น chelating resin มีส่วนประกอบเป็น styrene divinylbenzene copolymer มี iminodiacetate ion เป็นคู่สามารถจับกับ polyvalent metal ion ได้ดี ดังนั้น Chelex สามารถป้องกันการสลายตัวของดีเอ็นเอเนื่องจากความร้อนในระหว่างการต้มเพื่อสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ โดยไปจับกับ metal ion ซึ่งเป็น catalyst ทำให้ดีเอ็นเอสลายตัวได้เมื่ออยู่ในตัวกลางที่มีอุณหภูมิสูงและ low ionic strength[18] Chelex เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องใช้ organic solvent ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ แต่ดีเอ็นเอที่สกัดจาก Chelex มีข้อเสียคือไม่สามารถนำไปวัดปริมาณด้วยการตรวจ OD ที่คลื่นแสง 260 nm ได้ เนื่อง

จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก Chelex บางส่วนเป็น single strand บางส่วนเป็น double strand ทำให้เมื่อนำไปวัด OD 260 จึงมีปริมาณมากกว่าความเป็นจริง การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก Chelex ต้องทำด้วยวิธี hybridization แต่ในทางปฏิบัติอาจไม่จำเป็นเพราะดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ PCR มีพิสัยกว้างและจำนวน genome copies สามารถคำนวณได้จากปริมาณเลือดที่นำมาสกัด

การทำ PCR-SSP เพื่อตรวจ O allele เป็นวิธีที่รวดเร็วและประหยัดเพราะไม่ต้องใช้ restriction enzyme แต่ยังมีข้อเสียเนื่องจากไม่มี internal control primer ในคนที่มี genotype AA, BB, AB ซึ่งไม่มี O allele จะไม่พบแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าดีเอ็นเอที่นำมาทำ PCR นี้มีคุณภาพต่อการเพิ่มขยายยืนหรือไม่ การตรวจ PCR-SSP อาจต้องพัฒนาไปอีกโดยเติม internal control primer ซึ่งมีความสามารถที่จะเพิ่มขยายดีเอ็นเอในคนได้ทุกหมู่ เพื่อเป็นการประกันคุณภาพของขบวนการเพิ่มขยายยืน แต่ควรพึงระวังว่า primer ที่เป็น internal control ต้องไม่รบกวนกับ primer ของ ABO alleles ที่ต้องการตรวจ

ผู้บริจาคโลหิต 70 ราย สามารถแยกลักษณะพันธุกรรมได้ 6 แบบคือ genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพียงต้องการทดสอบการใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อตรวจหา ABO genotype แต่ไม่ต้องการหา gene frequency จึงเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคแบบเลือกหมู่เพื่อให้ครอบคลุม ABO genotype ทั้ง 6 แบบ ในอนาคตถ้าได้มีการศึกษาเพิ่มเติมอาจตรวจหา gene frequency ซึ่งการศึกษา gene frequency ต้องเก็บตัวอย่างเลือดแบบสุ่มอย่างน้อย 300 ราย 20 และต้องคำนวณ gene frequency ที่ตรวจได้ว่าเป็นไปตาม Hardy-Weinberg equilibrium หรือไม่

$p + q + r = 1$ และ

$p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$

โดยให้

p = frequency of A allele;

q = frequency of B allele;

r = frequency of O allele

นั่นคือคนหมู่เลือด O (OO) มี gene frequency เท่ากับ r^2 หมู่เลือด A (AA มี gene frequency เท่ากับ p^2, AO มี gene frequency เท่ากับ 2pr) หมู่เลือด B (BB มี gene frequency เท่ากับ q^2, BO มี gene frequency เท่ากับ 2qr) และหมู่เลือด AB (AB) มี gene frequency เท่ากับ 2pq แต่ถ้ายีนในกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษามีการผ่าเหล่า genetic drift การอพยพเคลื่อนย้าย และการแต่งงานที่เป็น nonrandom mating Hardy-Weinberg law อาจนำมาใช้ไม่ได้

การตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี serology โดยอ่านปฏิกิริยา agglutination จาก cell grouping และ serum grouping ทำให้แยก ABO subgroup จากหมู่เลือดปกติได้[13] A_{weak} และ B_{weak} มีแอนติเจน A และ B บนผิวเซลล์อ่อนกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งอาจเกิดจากการมี mutation ทำให้การสร้างเอนไซม์ที่มีคุณภาพต่างกันจึงสร้างแอนติเจนได้น้อยลง[8] มีผู้รายงาน A_{weak} เกิดจากการมี point mutation ที่ตำแหน่ง 646(T⟶A), 871(G⟶A), 1054(C⟶T), 1054(C⟶G), 1060(C⟶del) หรือ hybrid A-O1v allele ใน intron 6[5,21-23] B_{weak} เกิดจาก point mutation ที่ตำแหน่ง 641 (T⟶G), 669(G⟶T), 871(G⟶A) และ 1054 (C⟶T)[5,24] การตรวจ ABO alleles ด้วยวิธี PCR-RFLP และ PCR-SSP[16] นอกจากตำแหน่ง 703(G⟶A) และ 261(G⟶del) แล้วยังสามารถตรวจที่ตำแหน่งอื่นได้อีกคือตำแหน่ง 467, 526, 796, 803, 871 และ 1096 ตำแหน่ง 526(C⟶G), 796(C⟶A), 803 (G⟶C) และ 1096(G⟶A) ใช้ตรวจแยก B allele ตำแหน่ง 467(C⟶T) ใช้ตรวจแยก Asian A^1, A^2 และ *cis*-AB allele ตำแหน่ง 871(G⟶A)ใช้ตรวจแยก A^3 และ Bx A^1[467(C⟶T)] เป็น A^1 allele ซึ่งพบมากที่

สุดในคนเอเชีย[25] A^2 allele มีตำแหน่ง 467(C⟶T) ร่วมกับ nucleotide deletion ที่ตำแหน่ง 1060(C⟶del) ทำให้เกิด frameshift reading frame จึงขยายออกเป็น 1,129 bp *cis*-AB allele มี point mutation ที่ตำแหน่ง 467(C⟶T) และ 803(G⟶C) ทำให้การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนเปลี่ยน (construct protein เปลี่ยนเป็น AAAB) เกิด abnormal enzyme ที่สร้างได้ทั้งแอนติเจน A และ B[26] คน *cis*-AB มีการตรวจ serology เป็น A_{weak} B_{weak} (A_2B_3) เกิดจากบิดาหมู่ AB และมารดาหมู่ O คน *cis*-AB มี genotype เป็น *cis*-AB/O สำหรับการศึกษานี้ผู้บริจาคหมู่ A_{weak} B ไม่มี O allele จึงไม่น่าเป็น *cis*-AB ในกรณีคน $B^{(A)}$ phenotype มีการตรวจ serology เป็น A_{weak} B และพบ anti-A ในซีรัม $B^{(A)}$ allele เกิดจากการมี mutation ที่ตำแหน่ง 657(T⟶C) และ 703(A⟶G) จาก B allele (construct protein เปลี่ยนเป็น BABB)[27] ผู้บริจาครายนี้ไม่พบ anti-A ในซีรัมจึงไม่น่าเป็น $B^{(A)}$ phenotype การศึกษานี้ไม่สามารถบอกได้ว่าผู้บริจาค A_{weak} B และ B_{weak} มีความผิดปกติที่ตรงไหนเนื่องจากตรวจ ABO alleles เพียง 2 ตำแหน่งคือ 261(G⟶del) และ 703(G⟶A) การหาความผิดปกติของ A_{weak} B และ B_{weak} ควรตรวจ PCR-RFLP และ PCR-SSP ที่ตำแหน่งอื่นอีก และควรตรวจยืนยันผลลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing ซึ่งต้องมีการศึกษากันต่อไป

สรุป

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือด ABO มีพื้นฐานจากการที่มี point mutation ระหว่าง A, B และ O allele B allele แตกต่างจาก A allele ที่ตำแหน่ง 703(G⟶A) O allele แตกต่างจาก A และ B allele ที่ตำแหน่ง 261(G⟶del) การทำ PCR-RFLP โดยใช้ primer ABOF624-649/R770-798 amplify ABO alleles คร่อมบริเวณ exon 7 แล้วใช้ *Hpa* II หรือ *Alu* I ย่อยเป็นการตรวจ B allele ที่ตำแหน่ง 703 (G⟶A) primer mo-57/mo-46 ใช้ amplify ABO alleles คร่อมบริเวณ exon 6 โดยมี *Kpn* I ย่อยเพื่อตรวจ O allele ที่ตำแหน่ง 261(G⟶del) เมื่อนำ cleavage product ที่ได้มาแปลผลร่วมกัน ทำให้สามารถแยกหมู่เลือดได้เป็น genotype OO, AA, BB, AB, AO และ BO การตรวจ ABO genotype ด้วยวิธี PCR-RFLP ได้ผลสอดคล้องกับการตรวจยีน O จาก PCR-SSP ร่วมกับการตรวจ phenotype ด้วยวิธี serology ดังนั้นวิธี PCR-RFLP อาจนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจทางนิติเวช เช่น ราก ผม และเนื้อเยื่อต่างๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยนิติพันธุศาสตร์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความร่วมมือต่อการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. *Quinley ED, ed. Immunohematology: principles and practice. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1998: 91-110.*
2. *Brecher ME, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Bank 2002:271-93.*
3. *Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, eds. Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. London: Blackwell Science 1997:115-50.*
4. *อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. Molecular genetic of ABO blood group. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545; 12:69-76.*
5. *Chester MA, Olsson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. Transfus Med Rev 2001;15:177-200.*
6. *Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. Vox Sang 2000;78(suppl 2):91-103.*

7. Schenkel-Brunner H. Human blood groups : chemical and biochemical basis of antigen specificity. 2nd ed. New York : Springer-Verlag Wien, 2000:54-183.
8. Yip SP. Sequence variation at the human ABO locus. Ann Hum Genet 2002;66:1-27.
9. Brecher ME, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda, Maryland : Am Assoc Blood Bank 2002:670-1.
10. Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O 2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. Vox Sang 1995;69:242-7.
11. Olsson ML, Chester MA. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. Vox Sang 1996;70:26-30.
12. Ladd C, Bourke MT, Scherczinger CA, Pagliaro EM, Gaensslen RE, Lee HC. A PCR-based strategy for ABO genotype determination. J Forensic Sci 1996;41: 134-7.
13. Lee JC, Chang JG. ABO genotyping by polymerase chain reaction. J Forensic Sci 1992;37:1269-75.
14. Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. Blood 1996;88:1852-6.
15. Lee JC, Tsai LC, Chen CH, Chang JG. ABO genotyping by mutagenically separated polymerase chain reaction. Forensic Sci Int 1996;82:227-32.
16. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies : identification of 15 novel A and B subgroup alleles. Blood 2001;98: 1585-93.
17. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus : a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. Transfus Med 2001;11:295-313.
18. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechiques 1991;10: 506-13.
19. ศิริพร พันธ์ศรี, ธานินทร์ ภู่พัฒน์, สุภารัตน์ อุดมวิเศษ. การตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือดระบบ ABO โดยวิธีเซโรวิทยาและ polymerase chain reaction. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2544;34:163-6.
20. Yip SP, Yow CM, Lewis WH. DNA polymorphism at the ABO locus in the Chinese population of Hong Kong. Hum Hered 1995;45:266-71.
21. Olsson ML, Chester MA. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. Transfusion 1996;36: 309-13.
22. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system : 1. weak subgroups : A^3 and B^3 alleles. Vox Sang 1993;64:116-9.
23. Olsson ML, Chester MA. Heterogeneity of the blood group Ax allele : genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. Transfus Med 1998;8:231-8.
24. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. Blood 1996;88:2732-7.
25. Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. Blood 2000;95:1487-92.
26. Yamamoto F, McNeill PD, Kominato Y, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system : 2. cis-AB alleles. Vox Sang 1993;64:120-3.
27. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system : 3. A^x and $B^{(A)}$ alleles. Vox Sang 1993; 64:171-4.

ABO Genotyping by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

Ruangrong Cheepsattayakorn, Tanin Bhoopat*, Heinrich F. Steger*, Pranee Pisaipong, and Ladda Fongsatitkul****

*Department of Pathology; *Department of Forensic Medicine; **Blood Bank, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200*

Background: *The ABO phenotype is controlled by A, B and O genes. The B allele differs from the A allele at positons 526 (C⟶G), 703(G⟶A), 796(C⟶A) and 803(G⟶C) which cause amino acid changes. The O allele differs from the A and B alleles at position 261(deletion of G), this causes a shift in the reading frame that creates a premature stop codon.* ***Objective:*** *To determine ABO genotype by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)* ***Materials and Methods:*** *Blood samples were collected from 70 blood donors including 20 donors with group O, 20 with group A, 20 with group B and 10 with group AB. ABO phenotype was identified by red cell and serum grouping. Red cell typing was performed by standard tube tests using anti-A, anti-A1, anti-B and anti-A,B monoclonal antibodies. Serum grouping was done with standard A_1 and B cells. DNA was extracted from EDTA blood by the Chelex method. PCR was performed with primers mo-57/mo-46 and ABO F624-649/R770-798 to produce DNA fragments from exon 6 and 7, respectively. Exon 6 fragments from mo-57/mo-46 were digested with Kpn I which cleaved a specific GGTACC stretch in the O allele. In the exon 7 fragments from ABO F624-649/R770-798 amplicon, Hpa II cut a CCGG and Alu I cut a AGCT sequence in B alleles, respectively. Cleavage products were analyzed on 8.5% polyacrylamide gels. The polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) was performed with primers 261X/261C. PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel.* ***Results:*** *For the O allele, Kpn I generated 87 and 164 bp fragments for the mo-57/46 amplicons. A or B alleles lack a restriction site for Kpn I, the 252 bp amplicons were not cleaved. The 175 bp long ABO F624-649/R770-798 of A or O alleles were digested by HpaII to give 78, 19, 24 and 54 bp fragments. B alleles however gave 97, 24 and 54 bp fragments due to a base substitution at position 703(G⟶A). The 19, 24 and 54 long fragments cannot be detected because of the small amount of DNA in the corresponding bands. Alu I split the 175 bp ABO F624-649/R770-798 amplicons into two fragments of 81 and 94 bp for the B allele; A or O alleles were not cleaved. The ABO genotypes were determined by the intersection of the cleavage fragments from Kpn I, Hpa II and/or Alu I as follows; 1) genotype OO : 87 and 164 bp from Kpn I; 78 bp from Hpa II; 175 bp from Alu I. 2) genotype AA : 252 bp from Kpn I; 78 bp from Hpa II; 175 bp from Alu I. 3) genotype BB: 252 bp from Kpn I; 97 bp from Hpa II; 81 and 94 bp from Alu I. 4) genotype AB: 252 bp from Kpn I; 78 and 97 bp from Hpa II; 81, 94 and 175 bp from Alu I. 5) genotype AO: 87, 164 and 252 bp from Kpn I; 78 bp from Hpa II; 175 bp from Alu I 6) genotype BO: 87, 164 and 252 bp from Kpn I; 78 and 97 bp from Hpa II; 81, 94 and 175 bp from Alu I. In the PCR-SSP, the 195 bp amplicon for O allele was found. The ABO genotypes could be evaluated using O allele detection by PCR-SSP and ABO blood grouping by serologic method. The ABO phenotypes of 70 donors were as follows: 20 O; 20 A; 18 B; 9 AB; 2 B_{weak} and 1 $A_{weak}B$. ABO genotypes by PCR-RFLP and PCR-SSP were as follows: 20 OO; 3 AA; 17 AO; 6 BB; 14 BO; 10 AB. Both of the B_{weak} were heterozygous BO and the AweakB was genotype AB. Conclusion : The ABO genotype using PCR-RFLP can 1) give the result concordant with PCR-SSP for O allele and combine with blood group serology 2) show the result compatible to ABO phenotype. 3) apply with DNA samples from other types of tissues.*

Key Words : ● *ABO genotype* ● *ABO alleles* ● *PCR-RFLP*

Thai J Hematol Transf Med 2003;1:37-52.